

[DAL R. ISTITUTO DI STUDI SUPERIORI DI FIRENZE.
LABORATORIO DI PATOLOGIA GENERALE, DIRETTO DAL PROF. A. LUSIGNI].

RICERCHE SPERIMENTALI SUI TUMORI.

DOTT. PIETRO RONDONI, AIUTO E LIBERO DOCENTE.

Estratto dallo Sperimentale (Archivio di Biologia normale e patologica)
ANNO LXVII - FASC. II — MARZO-APRILE 1913.

[DAL R. ISTITUTO DI STUDI SUPERIORI DI FIRENZE.
LABORATORIO DI PATOLOGIA GENERALE, DIRETTO DAL PROF. A. LUSTIG].

RICERCHE SPERIMENTALI SUI TUMORI.

DOTT. PIETRO RONDONI, AIUTO E LIBERO DOCENTE.

Dal 1911 ad oggi ho atteso a ricerche molteplici sopra ai tumori, intese soprattutto a dilucidare certi punti della loro eziologia e biologia più controversi e più dibattuti in questi ultimi anni.

Siccome posso considerare come concluse certe serie di indagini, riporto qui in breve i risultati ottenuti, avvertendo che sarò il più possibile succinto nelle citazioni bibliografiche, limitandomi essenzialmente ad una esposizione sintetica del piano sperimentale e degli esiti osservati ed a pochi indispensabili commenti.

Certe serie di esperienze furono già da me comunicate all'Accademia medico-fisica (V. Atti, *Sperimentale*, fasc. IV, 1912) e ciò che si riferisce ai rapporti fra blastomiceti e proliferazioni epiteliali sperimentali da Sudan III nel padiglione auricolare del coniglio fu pure da me precedentemente pubblicato per esteso.

Posso dire che in quasi tre anni di lavoro ho preso in esame i seguenti punti:

Importanza eziologica dei blastomiceti.

Ricerche diverse su tumori trapiantabili del ratto (sarcoma) e del topo (adenocarcinoma).

Ricerche sopra agli innesti embrionali omogenei nel ratto, ed eventuale influenzamento di tali innesti per parte di interventi diversi.

Tentativi di trapianti di tumori umani negli animali.

Osservazione di tumori spontanei in animali.

I. Importanza eziologica dei blastomiceti.

Le mie ricerche sono una prosecuzione di quelle molto ampie di *A. Franchetti*, da questi eseguite fino dal 1908 nel Laboratorio di Patologia generale di Firenze per studiare l'azione patogena dei microrganismi in parola e gli eventuali rapporti fra essi ed i tumori, asseriti anche ultimamente da *Sanfelice* e da *Leopold*. Credei utile di riprendere in esame la questione, nonostante i risultati costantemente negativi di *Franchetti*, e quelli pure negativi di altri ricercatori in altri Istituti, in seguito soprattutto alla comparsa del lavoro di *Galeotti* e *Pentimalli*, che aveva destato grande interesse e posto di nuovo l'argomento all'ordine del giorno. E, come questi ultimi autori, presi in esame principalmente l'azione delle culture morte e dei loro estratti (nucleoproteidi).

Lavorai su topi e ratti bianchi: ed eseguii le seguenti serie di esperienze:

1°. Topi inoculati prima sottocute, una o due volte nello stesso punto, con soluzione oleosa di Sudan III; poi sottocute o nel peritoneo, a distanza di un mese circa dall'iniezione di Sudan III, con dosi diverse, talora ripetute, di vecchissime brodoculture di *Saccharomyces neoformans* *Sanfelice*, preparate due anni prima da *Franchetti* e conservate al buio e chiuse alla lampada, e certo morte (prova culturale): le vecchie culture dovrebbero infatti adattarsi secondo *Sanfelice* ad esperimenti del genere ed essere ricche in tossine neoformanti. La iniezione precedente di olio-Sudan III doveva servire a creare dei punti di speciale predisposizione all'azione proliferativa dei pretesi veleni specifici. Topi trattati: n. 20; morti od uccisi dopo 2-5 mesi. Esito negativo; neanche il Sudan III ha prodotto fatti proliferativi dell'epitelio cutaneo al punto d'iniezione (cute del dorso o del ventre).

2°. Topi trattati con dosi piccole (0,05-0,1) e ripetute parecchie volte delle stesse brodoculture vecchissime e morte, senza combinazione col Sudan III. Su 20 animali dopo 3 mesi di osservazione esito negativo per quanto riguarda la produzione di fatti proliferativi nei vari organi (anche all'esame microscopico minuto di essi).

3°. Topi trattati una volta con dosi fra 0,5 e 1,0 cmc. di estratti di *Saccharomyces neof.* preparati così: trattamento di patine culturali (agar acido glucosato) con potassa caustica 1 % per 20 ore a temp. di stanza; filtrazione per carta delle emulsioni alcaline, in cui i germi sono restati molto ben conservati come forma; la massa raccolta sul filtro si stempera in acqua distillata; e tale emulsione si tiene 24-72 ore a 37°; dopo questa specie di autolisi pare che un certo numero di blastomiceti si sia disciolto, ma molti germi sono ancora interi e assai ben conservati. Su 10 topi così trattati esiti sempre negativi.

4°. Esperienze con estratti, ottenuti mediante alcali e successiva acidificazione, vale a dire col metodo usato fondamentalmente dopo *Lustig* e *Galeotti* per estrarre i nucleoproteidi batterici. Occorre notare che a me è parso che non sia troppo facile estrarre il nucleoproteide dai blastomiceti; alla soluzione potassica 1 % molte cellule resistono benissimo, almeno conservano bene la loro forma. Quello che precipita alla successiva acidificazione, esaminato al microscopio, pare risultare in gran parte di cellule blastomicetiche molto ben conservate: si direbbe che l'alcali scioglie pochi blastomiceti o estrae da alcuni senza dissolverli un *quid* che potrebbe essere un nucleoproteide; e che poi questo poco nucleoproteide, sotto l'azione degli acidi, si coagula e precipita e trascina con se, precipitando, i più dei germi, che hanno resistito all'azione dissolvente dell'alcali. Ma, vista la resistenza dei germi alla potassa 1 %, potrebbe anche supporre che ciò che l'acido coagula e che provoca la precipitazione dei fiocchetti risultanti di corpi blastomicetici quasi intatti, non è nucleoproteide, ma forse un colloide che si trova nelle masse culturali, fra le cellule, proveniente da queste e dai loro involucri, e che è sensibile alla modificazione di reazione; allo stesso modo che i batteri vengono agglutinati da certe concentrazioni di H-ioni (*Saïreagglutination* di *Michaelis*).

Per avere un estratto, senza germi interi o quasi senza, occorre perciò prolungare il trattamento potassico per almeno 24 ore, eppoi filtrare per un filtro da batteriologia; allora, acidificando, precipitano *scarsi* fiocchetti, che veramente corrispondono al nucleoproteide, quale si estrae da altri batteri; oppure si può filtrare per carta, acidificare, il precipitato (cellule intere ancora presenti) emul-

sionarlo in soluzione 0,5 % di carbonato sodico e anche qui fare la filtrazione per il filtro da bacteriologia: ciò che passa è certo materiale sciolto, corrispondente ai corpi complessi che chiameremo nucleoproteidi e che provengono dai blastomiceti, da quelli almeno che la potassa ha sciolto.

Io ho cercato anche di produrre la dissoluzione delle cellule blastomicetiche con *antiformina*; l'antiformina scioglie questi microrganismi secondo le mie esperienze (non credo altri abbia saggiato i blastomiceti di fronte alla antiformina) quasi completamente in poche ore, usata al 5 % (diluzione con acqua distillata); ma anche in concentrazione minore agisce molto meglio della potassa. Agisce egualmente a 37° ed a temperatura di stanza. Agisce più su culture vecchie che su culture giovani. Pare che sulla resistenza alla antiformina influisca anche il terreno su cui sono cresciuti i blastomiceti.

Io ho usato antiformina 5 % per 6 ore a 37°; la emulsione antiforminica dei blastomiceti appare opalescente, e contiene pochissime cellule riconoscibili. Si procede poi alla acidificazione come nel metodo classico; il precipitato va ben lavato sul filtro di carta per allontanare le tracce di cloro; poi si risospende al solito in soluzione di carbonato di sodio 0,5 %. È da domandarsi se l'antiformina non distrugga le pretese tossine ad azione proliferativa; ma la stessa domanda può farsi anche per la potassa 1 %. La soluzione 5 % di antiformina contiene solo il 0,38 % di alcali; sicchè come alcalinità è inferiore alla soluzione potassica. D'altro lato, se è vero, come *Uhlenhuth* ha dimostrato, che l'antiformina distrugge molte tossine, è anche vero, sempre secondo *Uhlenhuth* ed allievi, che non distrugge i precipitogeni e gli agglutinogeni, perchè le culture sciolte in antiformina si prestano per ottenere sieri agglutinanti e precipitanti; sicchè non tutti gli antigeni paiono attaccati da questa sostanza, ma solo i più labili; e secondo *Sanfelice* le tossine specifiche dei blastomiceti parrebbero invece essere fra gli antigeni meno labili di fronte per es. alla conservazione.

Con estratti ottenuti coi vari metodi e che vogliamo chiamare in genere *nucleoproteidi blastomicetici* ho trattato 20 ratti: 11 con nucleoproteide precipitato dall'estratto antiforminico, 9 con nucleoproteide ottenuto con estrazione potassica, nel modo detto. Le cul-

ture di *saccharomyces neof.* erano state fatte su dischi di barbabietole e lasciate invecchiare circa 30-40 giorni. Dose generalmente: 1 cmc. di soluzione il più concentrata possibile in carbonato di Na. Esiti: tranne qualche ratto morto pochi giorni dopo l'iniezione, a causa probabilmente della tossicità degli estratti, gli altri furono uccisi dopo 2-4 mesi dall'iniezione; e tutti quanti non offrirono fatti riferibili a neoplasie e nemmeno banali iperplasie o metaplasie di tessuti.

Sicchè io non posso che confermare i risultati di *Franchetti*: anche usando estratti speciali dei blastomiceti, anche cercando di predisporre comunque i tessuti degli animali alla produzione di fatti proliferativi, non mi è riuscito di dimostrare azione alcuna del *saccharomyces neoformans* in questo senso. Ho avuto solo qua e là banali fatti di degenerazioni nei parenchimi degli organi; in certi topi della serie 3^a fatti di infiltrazione parvicellulare della mucosa gastrica e del fegato; in un topo della serie 1^a, morto 11 giorni dopo l'iniezione di brodocultura morta, ho visto nel polmone i setti interalveolari ispessiti e parzialmente infiltrati da grossi elementi cellulari a tipo di cellule epiteliodi, come un processo cirrotico iniziale, piuttosto diffuso. Molti topi e qualche ratto hanno presentato milza piuttosto voluminosa, con iperplasia linfoide e con aumento delle cellule giganti, come dirò anche in seguito. Da tutto ciò non si ricava nulla per ammettere una azione neoformante dei blastomiceti. Io rendo noti ora questi miei reperti negativi, avendo veduto come di tanto in tanto qualche autore sia di nuovo tornato sull'argomento, taluni con risultati favorevoli alla teoria blastomicetica (*Leopold*, *Sanfelice*, *Pentimalli*), taluni con risultati completamente negativi come i miei (*Loeb*, *Moore* e *Fleisher*), per quanto riguarda la produzione di neoplasie.

Non mi pare inopportuno, a spiegazione di certi reperti positivi, invocare certi dati desunti dalle ricerche di *Wasielewski* sulla frequenza dei tumori spontanei fra gli animali, specialmente a seconda della provenienza e della razza. Questo Autore ha infatti osservato come perfino il 50 % dei polli provenienti da dati villaggi possano presentare tumori maligni spontanei: dal che si desume, secondo me, la necessità di usare gran prudenza prima di attribuire ad un intervento sperimentale la produzione di tumori e di infor-

marsi ad ogni modo sull'origine degli animali, eseguendo numerose ricerche di controllo su altri animali non trattati di eguale provenienza ed eventualmente di eguale covata.

II. Ricerche sul sarcoma del ratto e sull'adenocarcinoma del topo.

Durante gli anni scolastici 1910-11 e 1911-12 abbiamo avuto in laboratorio un ceppo di sarcoma del ratto (bianco) virulentissimo, proveniente originariamente dall'Istituto di *Ehrlich* ed a noi inviato gentilmente dal prof. *Fichera* di Roma; i caratteri generali di virulenza di tale tumore ho già descritto nella mia nota precedente (*Sperimentale*, fasc. IV, 1912).

Quest'anno poi ho potuto fare alcune esperienze con un adenocarcinoma dei topi bianchi, datomi a Berlino dal prof. *Wassermann*; questo cancro sui nostri topi provenienti da allevamenti in campagna nei dintorni di Firenze, ha attecchito molto male nei primi tempi, tanto che io credevo di perderlo; poi si è elevato nelle percentuali di attecchimento, è arrivato attorno al 50 % e nell'ultimo trapianto fatto ha attecchito su 26 di 30 topi (circa 80 %). Non sono mancate le regressioni spontanee. Lo sviluppo è sempre stato assai lento, dopo 1 mese le dimensioni non arrivando mai a più di quelle di una grossa noce. Negli ultimi trapianti del cancro, colla quota di attecchimento, si era anche elevata la rapidità dello sviluppo; per innesto sottocutaneo sul dorso non è stata rara (su almeno 8 degli ultimi 30 topi innestati) la corrosione dei muscoli e delle fasce del dorso e la penetrazione nella cavità addominale, con avvolgimento del rene, aderenza alla milza, fegato, pacchetto intestinale; in un topo si sono anzi avute vere ripetizioni per disseminazione lungo l'omento, alla superficie del fegato e della milza, fra le anse intestinali. Mai si ebbero in seguito ad iniezione sottocutanea (poltiglie o frammenti) metastasi macroscopiche a distanza, da far supporre un trasporto embolico per via ematogena (polmoni).

Riassumo in poche proposizioni i risultati ottenuti lavorando col sarcoma e col cancro.

Volli vedere anzitutto con quali mezzi si potessero influenzare artificialmente i diversi elementi che compongono la così detta vi-

rulenza dei tumori: elementi che sono: la quota di attecchimento, la rapidità dello sviluppo, la tendenza infiltrante ed a dare metastasi.

Ho trovato che il trattamento preventivo degli animali (ratti) con poltiglie neoplastiche (sarcoma) scaldate $1/2$ ora a 55° , secondo il procedimento di *Flexner* e *Jobling*, non ha costantemente influenza nel senso di elevare la quota di attecchimento e la rapidità di sviluppo del sarcoma, come *Flexner* e *Jobling* hanno visto accadere per il loro tumore misto; però pare che venga accentuata notevolmente la tendenza infiltrante del tumore, come si può riconoscere paragonando lo sviluppo neoplastico nei ratti trattati in precedenza con poltiglie scaldate a quello nei ratti controllo. Le modalità e gli esiti di questa serie di esperienze sono minutamente descritti nella mia nota precitata.

Invece al nucleoproteide estratto col metodo di *Wooldridge* dal sarcoma, inoculato ad alta dose e più volte fino a pochi giorni avanti l'innesto del tumore, spetta un alto potere accelerante sullo sviluppo del tumore medesimo; si direbbe che il nucleoproteide neoplastico dà dei fatti di ipersensibilità, quali si sono osservati con altri interventi, per es. talora coll'inoculazione di tessuti di specie zoologica diversa (*Bashford*, *Murray*, *Haaland*, *Lewin*, *Gussio*) o anche coll'inoculazione di tessuti omogenei neoplastici o normali in date condizioni (*Gierke*, *Moreschi*). Non pare aversi alcuna azione del nucleoproteide, quando questo lo si inoculi in animali già portatori del tumore. Soggiungo che col nucleoproteide estratto col solito metodo dall'adenocarcinoma del topo non ho rilevato l'azione accelerante dimostrata per il sarcoma del ratto: i topi, trattati preventivamente col nucleoproteide del cancro, non hanno presentato nessun fatto apprezzabile di ipersensibilità all'inoculazione successiva del cancro stesso.

Se questo fatto, della impossibilità di provocare una spiccata ipersensibilità all'innesto col nucleoproteide del cancro, non fosse per avventura dovuto a una particolarità del ceppo di cancro usato, potrebbe forse pensarsi che anche qui si affermi una certa diversità nelle leggi di accrescimento fra carcinoma e sarcoma, diversità che risulta anche da altri fatti messi in luce specialmente dal *Centanni* (cancro sensibile all'azione blastica positiva dell'indolo, sarcoma insensibile).

Ho studiato anche l'azione di varie sostanze chimicamente semplici e ben definite sullo sviluppo del cancro e del sarcoma: il glucosio ha una azione accelerante, iniettato in larghe e ripetute dosi nel peritoneo dei ratti durante lo sviluppo del sarcoma. Invece l'anemia sperimentale (provocata con fenilidrazina) porta ad un notevole rallentamento e perfino alla regressione del neoplasma, d'accordo coi risultati di *Joannovics*. Risultati incerti hanno dato (sul cancro dei topi) l'acido lattico e l'oleato sodico.

Il *pituglandol Roche* ha pure dato risultati poco chiari: pare semmai che questo estratto ipofisario abbia favorito un poco lo sviluppo del cancro (6 iniezioni di 0,1 l'una ad intervalli uguali, a cominciare da una settimana dopo l'innesto fino a un mese dopo questo): così quel topo, cui si è accennato in principio, con invasione dal sottocutaneo nella cavità peritoneale e disseminazione, apparteneva ai topi trattati con *pituglandol*. Da un attento confronto coi controlli non oserei però affermare con tutta certezza una sicura azione favorente del *pituglandol* nelle dosi dette.

Durante queste ricerche ho rivolto la mia attenzione al comportamento della milza, che io notai di regola ingrossata nei ratti portatori di sarcoma, prima anche di prender visione dei lavori di *Brancati*, *Cimoroni*, *Hansemann*, *Medigreceanu*, *Morpurgo* e *Donati*, che hanno minutamente studiato il fatto interessante dell'ipertrofia splenica da tumore trapiantabile in sviluppo, cui va aggiunta l'osservazione della frequente atrofia splenica negli uomini morti per neoplasma maligno (*Fichera*, *Ricci*). Dopo numerosissime pesate, non posso che confermare il fatto dell'aumento di peso della milza nei portatori di tumore: per i ratti con sarcoma ben sviluppato ed in stato progressivo il peso medio della milza, chiamando 100 il peso corporeo, è risultato, su un centinaio di pesate, eguale a 0,907; mentre nei ratti normali il peso medio sarebbe secondo le mie pesate attorno a 0,30; ed anche *Magnan* dice che negli animali di regola la milza pesa 2 gr. per Kilo di peso corporeo ($= 0,2$ su 100), e *Richet* nel ratto, topo, cane (omnivori), ha trovato che la milza pesa fra 2,72 e 4,1 per kgr. ($= 0,27$ e $0,41$ per 100). Nei ratti in cui il sarcoma non è attecchito o è regredito si sono trovati pesi medi presso a poco eguali ai normali. I diversi interventi modificanti la virulenza dei sarcomi hanno poco

influenzato il peso splenico; solo è da rilevare che nei ratti portatori di sarcoma, trattati preventivamente con nucleoproteide neoplastico, e posti quindi in stato di ipersensibilità, il peso splenico era un po' inferiore alla media degli altri ratti con sarcoma: era 0,86 invece che 0,907 su 100 di peso corporeo. Per quanto riguarda il cancro dei topi, ho trovato meno forte l'aumento di peso della milza nei topi cancerosi in confronto ai topi con tumore regredito o in cui il tumore non era attecchito; però la differenza era sempre assai netta: specialmente poi fra topi cancerosi e topi normali.

Istologicamente nei topi e ratti predominano, quando l'ipertrofia splenica da tumore è spiccata, le caratteristiche ormai note: iperplasia dei follicoli e loro diffusione, numerose cellule giganti nella polpa, a grosso nucleo centrale lobato o frammentato.

Farei però delle riserve sulla specificità di tale quadro istologico: molte altre volte, in cui la milza è ipertrofica, per le cause le più svariate, possono comparire modificazioni simili di struttura, anche all'infuori dell'influenza dei tumori. La milza di animali (topi, ratti) affetti da tripanosomiasi, la milza di animali trattati con prodotti o estratti blastomicetici può essere al microscopio perfettamente eguale a quella dei soggetti portatori di tumori, per non ricordare che fatti che rientrano nella mia esperienza recente. Nè il trovare nella milza simili alterazioni dopo il trattamento con estratti blastomicetici fornirà un argomento alla teoria di *Sanfelice*, perchè anche il *Donati* di recente non ha potuto trovare correlazioni di sorta fra blastomiceti e tumori trapiantabili degli animali. La milza in questi animali contiene già normalmente cellule giganti; e reagisce con facilità, in modo simile, almeno per il quadro istologico, alle influenze le più diverse: anche la ipertrofia durante lo sviluppo del tumore è forse più che altro espressione del turbato ricambio materiale in seguito alla presenza del neoplasma. Credo che occorra molta prudenza nell'affermare un significato protettivo o difensivo rilevante di tale iperfunzione splenica, quale molti autori tendono ad ammettere in base ad argomenti diversi (si vedano i lavori dei già citati autori italiani, di *Brauenstein*, *Woglom*, *Lewin* e *Meidner*, *Apolant*, *Oser* e *Pribram*, ecc.). A me pare che le stesse considerazioni di *Cimoroni*, che rileva come simile quadro

istologico si abbia nella milza (e nel fegato) nelle condizioni le più svariate, quali la anemia da salasso, la gravidanza, neoformazioni sistematiche midollari e periostali, l'infezione malarica, siano piuttosto atte a togliere valore e significato particolare al reperto: nè vale il dire che tutte queste condizioni hanno a comune l'elemento: proliferazione di tessuti; perchè si tratta di proliferazioni sostenute da cause troppo diverse, con finalità oltremodo differenti per l'organismo, tanto che a me pare azzardato un ravvicinamento ed una spiegazione schematica ed unicista.

Nei topi, in cui il cancro non attecchì o regredì tosto spontaneamente, ho trovato talora la milza in stato di sclerosi, con ispessimento del reticolo della polpa, che era ridotta talora a trave e blocchi di sostanza connettivale ialina, in cui restavano ancora poche cellule; con follicoli ridotti, diradati nella loro compagine, attorno ad arteriole a parete sovente ispessita.

Ora questa sclerosi non poteva essere effetto secondario a precedente iperplasia con iperfunzione, come potrebbe essere a proposito della atrofia e sclerosi splenica descritta da *Ricci* nell'uomo con neoplasma: infatti qui si tratta di topi uccisi un mese circa dopo la inoculazione del cancro, la cui milza quindi non poteva avere avuto il tempo di passare per una fase iperplastica ed arrivare ad una sclerosi così pronunziata, anche stando ai dati di *Cimoroni*, secondo cui uno stato consimile della milza si ha nei topi a cancro progressivo quando essi sono arrivati all'ultimo periodo cachettico e furono vinte tutte le resistenze organiche. *Cimoroni* trova la fase iperplastica della milza arrivare fino al 40° giorno dalla inoculazione, e solo da allora *iniziarsi* la regressione e l'atrofia; sicchè i quadri *terminali* visti da me devono avere avuto un periodo più lungo di svolgimento e fanno pensare che la sclerosi splenica preesistesse alla inoculazione del cancro. Io credo si avesse a fare con topi vecchi, a milza sclerotica perchè vecchi e refrattari al cancro perchè vecchi (cosa ormai nota per i tumori sperimentali trapiantabili ed esattamente opposta al comportamento dei tumori primitivi dell'uomo e degli animali). Ma non potrei portare in alcun modo la refrattarietà in relazione con lo stato della milza, chè in questo caso anzi, se la milza avesse funzione antagonista al neoplasma, questo, data la primitiva deficienza sple-

nica da sclerosi dell'organo, avrebbe dovuto attecchire meglio del solito.

Io penso, in base al materiale da me osservato, che in tali casi la sclerosi splenica e la refrattarietà al tumore discendano ambedue parallelamente dalla stessa causa, la senilità dell'organismo, colle inerenti alterazioni biochimiche e morfologiche.

III. Innesti embrionali omogenei nei ratti.

Un altro soggetto ho creduto interessante di prendere in esame, parallelamente a queste ricerche sui tumori: lo studio dei *teratoidi sperimentali*, come *Askanazy* chiama impropriamente gli innesti ad attecchimento positivo di tessuti embrionali di ratto nel peritoneo o sottocute in ratti adulti, studiati già molto bene da *Fichera*, e recentemente da *Paula Freund* e molti altri.

Io ho sperimentato su 59 ratti, iniettando sempre nel peritoneo poltiglie di embrioni di varia età, per lo più però corrispondente ad una lunghezza fra 1 e 2 cm. Io ho voluto vedere soprattutto questo: se si riesca ad influenzare o modificare lo sviluppo di questi innesti con sostanze e interventi diversi: e quindi ho diviso i ratti inoculati ogni volta collo stesso materiale embrionale in più lotti ed ho fatto precedere o seguire vari trattamenti:

1° Trattamento della poltiglia di embrioni all'atto dell'iniezione con acqua eterizzata 4‰, aggiunta a parti eguali alla poltiglia stessa; e ciò per vedere di controllare i dati di *Askanazy*, secondo cui a tale trattamento della poltiglia terrebbe dietro un maggiore sviluppo degli innesti e probabilmente sviluppo di vere neoplasie, per modificazione dei lipoidi delle cellule embrionali (*lipolytische Wachstumserregung*); tanto più che non mancano concezioni ipotetiche, appoggiate anche su qualche fatto sperimentale, che vedono nei lipoidi delle cellule l'apparecchio inibitore e regolatore della moltiplicazione, il cui danneggiamento potrebbe portare a fatti di sviluppo atipico e sconfinante. La poltiglia così trattata fu inoculata a 11 ratti; 4 di questi ebbero successivamente delle iniezioni ripetute di soluzione 1‰ di oleato sodico nel peritoneo.

2° Pochi (5) ratti furono trattati previamente all'innesto embrionale con 3 iniezioni intraperitoneali per ciascuno (l'ultima

10-15 giorni avanti l'innesto), di dosi alte di poltiglia di sarcoma scaldata $\frac{1}{2}$ ora a 55° , in considerazione dell'effetto favorevole allo sviluppo delle cellule neoplastiche che tali poltiglie scaldate paiono avere in molti casi, per vedere se un effetto consimile si ha sulle cellule embrionali.

3° Trattamento dei ratti dopo l'innesto e per un periodo più o meno lungo di tempo con plasma di ratto portatore di sarcoma in buon sviluppo progressivo, plasma che si sa essere sprovvisto del potere oncolitico proprio del plasma normale. Dalle ricerche di *Kraus*, *Ishiwara* e *Winternitz* infatti risulta che le cellule embrionali si comportano come quelle neoplastiche, venendo sciolte dal siero normale, non da quello dei cancerosi e del feto; io ho creduto non ingiustificato di trasportare queste cognizioni al nostro campo, e di vedere se, inoculando, a cominciare dal momento dell'innesto, del plasma di ratto con tumore, cioè plasma *non embriolitico*, si possa favorire l'attecchimento delle cellule embrionali, quasi se ne favorisse la cultura nel peritoneo dell'animale. Certo che queste esperienze (10 ratti) non sono facili, dovendo sacrificare molti animali col tumore in sviluppo, per avere quantità bastanti di siero. Alcuni ratti hanno avuto poche iniezioni di siero e solo i primi giorni (0,5-1,0 per volta), altri li ho trattati più a lungo, diradando poi le iniezioni. Si poteva anche supporre che col siero dei ratti sarcomatosi si trasportassero nei ratti innestati cogli embrioni dei principi attivatori della proliferazione. Altri 10 ratti per controllo hanno avuto siero normale di ratto sano.

4° Alcuni (5) ratti furono nei giorni dopo l'innesto trattati con poltiglie di milza di ratto normale e altri (4) con poltiglie di milza di ratto portatore di sarcoma. Le poltiglie di milza erano inoculate nel peritoneo ($\frac{1}{2}$ milza per volta ad ogni ratto innestato), e di tali inoculazioni ogni ratto ne ebbe da 3 a 5; alcune volte invece dell'iniezione intraperitoneale fu fatto l'innesto nel sottocutaneo di pezzetti di milza, che doveva poi riassorbirsi e mettere in libertà così i suoi principi. Queste poche esperienze furono fatte, perchè *Askanazy* dice che gli animali splenoectomizzati non si prestano all'attecchimento degli innesti embrionali; ora io volli vedere se viceversa trattando l'animale nei primi giorni dopo l'innesto con sostanze spleniche, si ha un qualche influenzamento del-

l'innesto stesso, che, stando ai dati di *Askanaxy*, sarebbe da aspettarsi in senso positivo.

5° Ratti di controllo, inoculati senz'altro con poltiglie embrionali (13).

I risultati furono nell'insieme poco favorevoli alle idee di *Askanaxy*. Il risultato dell'innesto fu positivo circa nel 50 % dei casi: però i casi positivi non predominavano in nessuna delle 5 serie sperimentali, erano assai uniformemente distribuiti. Come casi positivi ho designato quelli, in cui i ratti alla necropsia (dopo un tempo variabile dall'innesto, mai superiore a 4 mesi $\frac{1}{2}$) presentavano masse cistiche o compatte, noduli più o meno grossi sull'omento, sul peritoneo, attaccati ai visceri, talora peduncolati, talora come uniti in grappoli. Come si vede, io non posso parlare di un esito costantemente positivo degli innesti come fanno certi autori: del resto anche la *Freund* è lungi da ammettere un esito costantemente positivo, ed anch'essa non ha avuto alcun effetto dal trattamento delle poltiglie con etere. Anche per le dimensioni raggiunte dai teratoidi (per chiamarli così) non si hanno diversità importanti fra le varie serie: pare forse che un po' prevalgano quelli degli animali trattati con sostanze spleniche, ma si tratta di troppo pochi casi per trarne delle conclusioni.

Istologicamente l'esame degli innesti attecchiti non ha offerto nulla di speciale: i tessuti che meglio attecchiscono sono i connettivali, e specialmente la cartilagine; invece le formazioni epiteliali, per lo più a tipo alveolare o tubolare, ricordanti talora le ghiandole salivari, il rene, la tiroide, sono piuttosto rare. Nell'insieme non ho mai avuto un alto differenziamento di tessuti, e le zone di necrosi sono comparse precocemente ed abbondanti. Tutti gli svariati interventi adoperati non hanno condotto a speciali modificazioni del quadro istologico. Osservasi, nei ratti ad innesto positivo, un peso medio della milza un poco maggiore che nei ratti a sviluppo degli innesti nullo o scarso: 0,38 % contro 0,30 %: differenza non grande, ma che acquista più risalto, se si considera che la milza dei ratti con innesto positivo sacrificati un po' precocemente, 20-30 giorni dopo l'operazione, offre anche un quadro istologico analogo a quello offerto dai ratti con sarcoma, sebbene meno spiccato. Anche questo reperto non deve però farci troppo

proclivi a dare eccessiva importanza alla milza in questi processi: si può sempre pensare che l'innesto modifica più o meno certe intime funzioni del ricambio generale, e la milza, sensibilissima a stimoli d'ogni sorta, organo emopoietico ed emolitico, organo di difesa contro materiali estranei d'ogni genere, ricco in macrofagi e produttore di ormoni diversi, reagisce con facilità *anche* in seguito ad innesti embrionali.

IV. Inoculazione di tumori umani negli animali.

Ho tentato l'innesto in animali (topi, ratti, cani, cavie) di tumori umani, introducendo le poltiglie in cavità peritoneale ed uccidendo gli animali dopo vari mesi: ho inoculato finora 1 cancro linguale e 2 cancri ovarici, con esito sempre negativo.

V. Tumori spontanei osservati in animali.

Durante questi tre anni sono giunti alla nostra osservazione tre tumori spontanei di animali.

1° Un tumoretto trovato nella cavità peritoneale di una cavia, aderente per un largo peduncolo alla parete addominale, verso la parte posteriore ed in alto, senza rapporti con nessun viscere: istologicamente aveva la struttura di un linfangioendotelioma, e proveniva probabilmente dalla sierosa.

2° Un tumore nel fegato di un pollo; questo infiltrava diffusamente l'organo che era ingrossato, ed istologicamente poteva definirsi come un linfosarcoma, che dissocia e comprime le trabecole di tessuto epatico.

3° Un tumore in un ratto bianco femmina, a sede sulla parte laterale destra del collo e del tronco, a struttura alveolare: gli alveoli erano tappezzati da un epitelio cubico e ripieni di sostanza coagulata, omogenea; scarso in certi punti lo stroma connettivale, molto abbondante in altri, (ove gli alveoli erano piccoli, come schiacciati ed assottigliati), sempre molto fibroso. Origine probabile del tumore: la tiroide. Si aveva a fare probabilmente con un adenoma o adeno-fibroma della tiroide. Si tentò senza frutto l'innesto sottocute su altri ratti. I ratti innestati senza esito con

questo tumore offrirono questo fatto: alla iniezione successiva (dopo 40 giorni) col sarcoma virulento, essi morirono tutti in pochi giorni (da 2 a 25), come se fossero stati ipersensibili ad eventuali sostanze tossiche del tumore, il quale non presentò che un principio di attecchimento e tosto regredì in alcuni, in altri non attecchì affatto, ed in altri non fu potuto stabilire come si sarebbe comportato, per la morte precoce dell'animale.

Alla necropsia non si avevano lesioni degne di nota in questi ratti; in quelli morti prima, il frammento di sarcoma era ancora presente e ridotto ad una massa necrotica. In ratti controllo inoculati contemporaneamente collo stesso sarcoma, si ebbe attecchimento e vita a lungo degli animali.

Questa osservazione, che non ho potuto ripetere, potrebbe mettersi in rapporto con quelle di *Daels*, secondo cui il tessuto sarcomatoso è tossico, specie se necrotico, e lo è più per gli animali refrattari (come i miei ratti immunizzati coll'adenoma) che per i ricettivi.

Letteratura.

APOLANT, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 17, H. 2, 1913.

ASKANAZY, I Congresso internaz. dei Patologi. Torino, 1911.

BASHFORD, MURRAY a. HAALAND, III Scient. Rep. of Imp. cancer res. Fund.

BRANCATI, Tumori. Anno I, fasc. 2, 1911; Anno I, fasc. 5, 1912; Anno II, fasc. 1, 1912.

BRAUENSTEIN, Berliner Klin. Woch., n°. 45, 1911.

CENTANNI, Tumori. Anno II, fasc. 3, 1912.

CIMORONI, Tumori. Anno I, fasc. 4 e 6, 1912.

DAELS, Arch. d. médec. expér., T. 22, 1910.

DONATI, Pathologica. Anno IV, n°. 95, 1912.

FICHERA, V. le 2 annate di Tumori e il libro « Tumori », Unione tipogr.-edit. torinese, 1911.

FLEXNER a. JOBLING, Studies from the Rockefeller Institute for medical Researches, XII, 1911.

FRANCHETTI, Sperimentale, fasc. V, 1910.

FREUND P., Ziegler's Beiträge z. path. Anat., Bd. 51, 1911.

GALEOTTI, Sperimentale, anno LXV, fasc. 5-6.

- GALEOTTI u. PENTIMALLI, Centralbl. f. Bakt., I Abt. Orig., Bd. 56, H. 3-4, 1910.
- GIERKE, Citato da LEWIN.
- GUSSIO, Tumori. Anno I e II.
- JOANNOVICS, Wiener Klin. Woch., pag. 37, 1912.
- KRAUS, ISHIWARA u. WINTERNITZ, Deutsche med. Woch., pag. 303, 1912.
- LEOPOLD, Archiv. f. Gynäkol., Bd. 96, H. 3, 1912.
- LEWIN, Therapie d. Gegenwart, nov. 1911.
- LEWIN u. MEIDNER, Zeitschr. f. Krebsforsch., Bd. 11, H. 3, 1912.
- LOEB, MOORE, FLEISHER, Centralbl. f. Bakt. I Abt. Orig., Bd. 67, H. 6, 1913.
- MAGNAN, Compt. rend. d. l. Soc. d. Biol., 7 fevr. 1913.
- MEDIGRECEANU, Berl. Klin. Woch., n°. 13, 1910.
- MICHAELIS, Folia serologica, Bd. 7, H. 10, 1911.
- MORESCHI, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. Orig., Bd. 2, 1909.
- MORPURGO e DONATI, Atti I Congresso internazionale dei Patologi. Torino, 1911.
- OSER u. PRIBRAM, Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Therap., Bd. 12, 1913.
- PENTIMALLI, Centralbl. f. Bakt., I Abt. Orig., Bd. 66, H. 2-4, 1912.
- RICCI, Tumori. Anno II, fasc. 1, 1912.
- RICHET, Citato da MAGNAN.
- RONDONI, Sperimentale, anno LXV, fasc. 5-6, 1911.
- RONDONI, Atti Accad. med.-fis. fiorentina. Sperimentale, anno LXVI, fasc. 4, 1912.
- SANFELICE, Eziologia e cura dei tumori maligni. Unione tipogr.-edit. torinese, 1911.
- UHLENHUTH, Centralbl. f. Bakt. I Abt. Ref., Bd. 42, Beil.
- WASIELEWSKI, Centralbl. f. Bakt. I Abt. Ref., Bd. 54, Beil., pag. 111.
- WOGLOM, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 11, H. 6, 1911.
-

FIRENZE

SOCIETÀ TIPOGRAFICA FIORENTINA

33 - VIA S. GALLO - 33

1913